

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der
Universität Marburg

NACHWEIS DER BLUTGRUPPENSUBSTANZEN
A UND B IN BLUTSPUREN NACH VERDÜNNUNG
UND ABKÜHLUNG ANALOG DER EINWIRKUNG
VON SCHNEE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von —

DOROTHEA DUDA

aus Peiskretscham/Krs. Gleiwitz

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der
Universität Marburg

NACHWEIS DER BLUTGRUPPENSUBSTANZEN
A UND B IN BLUTSPUREN NACH VERDÜNNUNG
UND ABKÜHLUNG ANALOG DER EINWIRKUNG
VON SCHNEE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DOROTHEA DUDA
aus Peiskretscham/Krs. Gleiwitz

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 14.7.1978
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof.Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. I. Oepen

Coreferent: Prof. Dr. F. Schleyer

INHALT

	<u>Seite</u>
1. Einleitung: Bisherige Ergebnisse und Fragestellung.....	1
2. Material und Methoden.....	5
2.1. Schnee und Temperatur.....	5
2.2. Aqua bidestillata.....	6
2.3. Blut.....	6
2.4. Testseren und Testerythrozyten	7
2.5. Stabilisatoren.....	9
2.6. Verdünnungsgrad.....	12
2.7. Technik der Auswertung.....	13
3. Eigene Versuche.....	14
3.1. Vorversuche.....	14
3.1.1. Versuchsanordnung.....	14
3.1.2. Bewertung der ersten Ergebnisse.....	21
3.2. Hauptversuche: Ermittlung der optimalen Technik und Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit.....	22
3.2.1. Zulässige Schneemenge.....	24
3.2.2. Eignung der Zusätze.....	28
3.2.3. Optimale Temperatur.....	28
3.2.4. Nachweisdauer.....	33
3.2.5. Einbeziehung des Blutspurenüberstandes in die Untersuchung.....	39

	<u>Seite</u>
3.2.6. Unterschiedliche Behandlung des Zellsediments.....	40
3.2.7. Blindversuche.....	41
4. Zusammenfassung.....	45
5. Literatur.....	47

1. EINLEITUNG:

BISHERIGE ERGEBNISSE UND FRAGESTELLUNG

Anstoß zu dieser Arbeit gab ein Referat von BYRDY und ZABLOCKA, das 1971 in Berlin anlässlich der 3. Tagung der Gesellschaft für Gerichtliche Medizin vorgetragen wurde mit dem Thema: "Über die Blutgruppenbestimmung im Schnee aufgefundenener Blutspuren."

Über "Blutspuren im Schnee" ist außer dem Bericht der beiden polnischen Autorinnen nur eine Studie von SCHWARZACHER veröffentlicht worden, die jedoch keine Blutgruppenbestimmung behandelt. SCHWARZACHER beschreibt nur Größe, Form und Farbe der Blutspuren bei bestimmter Ausgangsmenge. Ferner wurde das Einsickern der Blutspuren an Schneeprofilen beobachtet sowie ihre Nachweisdauer bei unterschiedlichen Temperaturen.

BYRDY und ZABLOCKA berichten von einer "Hämolysereversion", mit deren Hilfe es gelingen soll, auch an aus Schnee isolierten Blutspuren die Blutgruppenmerkmale durch direkte Agglutination zu bestimmen. Dieses Verfahren wird sonst nur bei der Blutgruppenbestimmung an Frischblut angewandt, während die Merkmale an Blutspuren nur im sog. indirekten Verfahren bestimmt werden können und zwar im Absättigungsversuch oder im Absorptions- Elutionsverfahren (SCHLEYER, F. und I. OEPEN, s.dort weitere Literatur).

Gegenüber dieser aufwendigen Technik würde das Verfahren von BYRDY und ZABLOCKA zweifellos den Vorteil der Schnelligkeit besitzen; fraglich erscheint dagegen die Nachweissicherheit. Die Nachprüfung wurde erschwert durch ungenaue Angaben zur Methodik.

Für den Nachweis waren von den Autorinnen folgende, als optimal angesehene Bedingungen erarbeitet worden, die auch den eigenen Versuchen zunächst als Grundlage dienten :

- 1) Auftaugeschwindigkeit: die Proben sollen möglichst schnell bei Zimmertemperatur aufgetaut werden;
- 2) Außentemperatur : sie darf nicht kälter als -10°C sein;
- 3) Expositionsdauer : bei -10°C bis zu 24 h ;
- 4) Verdünnungsgrad des Blutes mit Schnee am besten nur 1:1 bis maximal 1:3.

Für die Hämolyseversion werden folgende Zusätze als notwendig angeführt:

- a) hypertone Lösung zum hypotonen Schneewasserhämolyrat "in einem der Schneewassermenge entsprechenden Quantum" zum Isotonieausgleich (Zusammensetzung s.u. 2.5.);
- b) (vermutlich zur Gerinnungshemmung) 3,8%ige Natriumcitratlösung "in einem der Blutmenge entsprechenden Quantum";

c) zur "Verlängerung der Vitalität der Erythrozyten"(gemeint ist wohl die Lebensdauer) CPD-Stabilisator(0,14 ml: 1 ml Blut).

Die drei genannten Reagentien seien den Schneespuren vor dem Auftauen zuzugeben.

Die Wirkung der Zusätze wird von BYRDY und ZABLOCKA folgendermaßen beschrieben: "Die Hämolysate trübten sich deutlich nach Hinzufügen der hypertonischen Lösung. In den Mikroskoppräparaten gestalteten sich die kaum schemenartig sichtbaren Blutkörperchenschatten als normale ,bikonkave Diskusse mit beigefärbten kugeligen oder maulbeerartigen Formen." Bei schwacher Verdünnung (nicht stärker als 1:1) genüge das Hinzufügen von physiol. NaCl-Lösung! Die geschilderte beachtliche Veränderung wird nicht näher erklärt, etwa durch Erläutern der Wirkung der in der Lösung enthaltenen Reagentien wie z.B. des $MgCl_2$.

Der CPD-Stabilisator bewirke wegen seines Gehaltes an Phosphaten ein Beibehalten des osmotischen Gleichgewichtes zwischen den Blutkörperchen und ihrem Milieu. Die Phosphate sollen eine hemmende Funktion im Ionenaustausch durch die Zellmembran haben; darüber hinaus seien sie Energiequelle im Glykolyseprozeß. Der Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels diene die Glukose.

BYRDY und ZABLOCKA bemerken noch einschränkend, daß die jüngeren Erythrozyten reaktionsfähiger als die älteren seien. Ebenso solle ATP die Reaktionsbereitschaft fördern. Die ersten Erfahrungen über die Hämolyseversion stammten aus früheren Versuchen mit hypotonischen Lösungen und wurden von den beiden Autorinnen für die Studie über Blutspuren im Schnee übernommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Reproduzierbarkeit der von den polnischen Autorinnen beschriebenen Technik zu prüfen und optimale Versuchsbedingungen für den Nachweis von Blutgruppensubstanzen an in Schnee aufgefundenen Blutspuren zu ermitteln.

Dabei wurde ebenso wie bei BYRDY und ZABLOCKA die Untersuchung auf die Blutgruppen A_1 , B und O beschränkt. Auf die beabsichtigte Einbeziehung von A_2 -Proben mußte verzichtet werden, weil schon die A_1 -, B- und O-Differenzierung problematisch blieb. Da Blut der Gruppe A_2 geringere Mengen an Blutgruppensubstanz enthält als A_1 -Blute, konnte von der A_2 -Diagnose kein brauchbares Resultat mehr erwartet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. SCHNEE UND TEMPERATUR

Die Hauptschwierigkeit lag zunächst darin, Schnee zu beschaffen und zwar möglichst unabhängig von der Jahreszeit.

Gelöst wurde das Problem durch den Einfall, die gefrorenen Kondenswasserbeschläge eines Kühlschranks und einer Kühltruhe abzuschaben, und damit ein Schneeäquivalent sowohl hinsichtlich der Konsistenz als auch der Substanz zu gewinnen. Gleichzeitig bot dieses Verfahren den Vorteil, von äußeren Temperaturschwankungen, wie sie im Verlauf des Jahres sowie zwischen Tag und Nacht auftreten, unabhängig zu sein.

Sehr erleichtert wurde die Arbeit dadurch, daß ein Kühlraum zur Verfügung stand. So konnten die Proben in aller Ruhe vorbereitet und inkubiert werden, ohne daß das Eisgeschässel schmolz.

Der "Schnee" wurde mit einem spitzen Skalpell von der Truhenwand geschabt, das Geschässel dann über einen Trichter mit Hilfe eines Metallspatels in Reagensgläser gefüllt. Abgemessen wurde die Schneemenge mit einem Laboratoriumsmeßlöffel; dessen Fassungsvermögen (ungefähr 10 Tropfen) wurde durch Zählen der Tropfen nach dem Auftauen des Schnees ermittelt.

Die Inkubationstemperatur für die Blutspuren

im Schnee wurde im Kùhlschrank mit Hilfe eines Thermometers eingestellt. Es wurde darauf geachtet, daß die Kùhlschranktür nur kurz geöffnet wurde, um die Temperatur möglichst konstant zu halten.

2.2. AQUA BIDESTALLATA

wurde in den Vorversuchen anstelle von Schnee verwendet, entsprechend den Vorversuchen von BYRDY und ZABLOCKA mit hypotonischem Medium.

Die Vorversuche dienten dazu, einen Überblick über die notwendigen oder noch zulässigen Mengenverhältnisse zu gewinnen.

Leitungswasser kam wegen der Chlorierung nicht in Frage und Aqua dest. stand lediglich als Aqua demineralisata zur Verfügung, so daß der Grad der bakteriellen Kontamination und dessen Auswirkung auf die Erythrozyten nicht vorhersehbar war. Deshalb kam nur Aqua bidest. als Schneeequivalent in Betracht.

2.3. BLUT

In die Reagenzgläser wurde auf das vorher abgefüllte und auf Kùhlschranktemperatur gebrachte Geschabsel (die Reagenzgläser wurden vorher 1/2-1 Stunde in den Kùhlschrank gestellt) zimmer-temperaturwarmes (zu der Zeit ca. 28°C), frisches

Citratblut der Gruppen A₁, B und O getropft⁽⁺⁾.
Damit erübrigte sich der nachträgliche Citratzusatz und die Interpretation der ungenauen Angaben der polnischen Autorinnen: "in einem der Blutmenge entsprechenden Quantum."

2.4. TESTSEREN UND TESTERYTHROZYTEN

Es handelte sich ausschließlich um Seren und Erythrozyten von Blutspendern.

Gewonnen wurden die Antiseren aus denselben Citratblutproben, mit denen die Versuchsansätze vorgenommen wurden. Die nach der Inkubation mit Schnee übriggebliebenen Blutreste wurden für 5 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert und das überstehende Plasma als Antiserum abpipettiert.

(Zur Technik siehe DAHR)

Verwendet wurde Anti-A (von B-Blut), Anti-B (von A-Blut) und Anti-AB (von O-Blut). Die Antiseren wurden ebenso wie die Blutkörperchensedimente bei +4 bis +6°C im Kühlschrank aufbewahrt; diese dienten als Kontrolle für die bei tieferen Temperaturen inkubierten Versuchsansätze.

(Weitere Kontrollen vergleiche die Versuchsansätze selbst unter Ziffer 3).

⁽⁺⁾ Herrn Prof. Dr. K. H. Müller sowie vor allem den Schwestern der Marburger Blutbank danke ich für die freundliche Bereitstellung der Blutproben.

Da die Versuche aus Kostengründen nicht mit käuflichen Immunantisera vorgenommen wurden, deren Titer bekannt ist, wurde jeweils der Titer der Probandenantisera bestimmt und dadurch die Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet.

Zur Titerbestimmung wurden die Seren in geometrischer Reihe auf einer Tüpfelplatte verdünnt.

Herstellung der Verdünnungsreihe:

Vorlage von 2 Tropfen 0,9%iger Kochsalzlösung in jede Aushöhlung der Tüpfelplatte; zu den ersten zwei Tropfen NaCl zwei Tropfen Antiserum mischen, so daß sich vier Tropfen in der ersten Höhlung der Platte befinden. Diese Mischung entspricht der Verdünnung $1+1 \hat{=} 1:2$. Davon werden zwei Tropfen abgenommen und zu den nächsten zwei Tropfen NaCl gegeben, so daß hier nun eine Verdünnung von $1:4$ vorliegt, in den folgenden Tüpfeln dann $1:8$, $1:16$ usw. Um die Verdünnungsreihe gegebenenfalls fortsetzen zu können, werden die verbleibenden zwei Tropfen des letzten Tüpfels in den nächsten leeren Tüpfel gefüllt und bleiben hier ohne weitere Zusätze.

Zu den je zwei Tropfen der Antiserumverdünnungsreihe gibt man je 2 gleichgroße Tropfen 5%ige Erythrozytensuspension. Sie wird gewonnen durch Zugabe von 1 Tropfen Erythrozytensediment/ml NaCl-Lösung. Abgelesen wird die Reaktion unter leichtem Rotieren der Platte nach frühestens 2 min. Der Titer

wird durch diejenige Verdünnungsstufe angegeben, die mit den Blutkörperchen eine gerade noch sichtbare Agglutination ergibt. Anti-AB-Serum wurde sowohl mit A- als auch mit B-Erythrozyten ausgetestet. Dabei zeigte sich durchweg, daß, wie bekannt, der Anti-A-Titer im AB-Serum höher ist als der Anti-B-Titer. Durchschnittlich bewegten sich die Titer in folgender Größenordnung:

Anti-A: 1:4 bis 1:8 maximal 1:16

Anti-B: 1:4 bis 1:8

Anti-AB: gegen A₁-Blutkörperchen 1:4 bis 1:8

Anti-AB: gegen B -Blutkörperchen 1:2 bis 1:4

2.5. STABILISATOREN

Als reaktionsverbessernde Zusätze wurden von BYRDY und ZABLOCKA verwandt:

- a) die hypertonische Lösung;
- b) der CPD-Stabilisator.

Dazu ist zu sagen:

zu a) die hypertonische Lösung (h.L.) besteht aus 9% NaCl + 1/10 mM MgCl₂; statt 9% NaCl könne auch 12% KCl genommen werden. Die bei uns nicht übliche Angabe - " + 1/10 mM MgCl₂" - wurde so verstanden, daß 9 g NaCl in 90 ml Aqua bidest. zu lösen und mit 10 ml (= 1/10 von 100) 1 mM MgCl₂ auf 100 ml aufzufüllen seien.

Während die Rolle der minimalen Menge MgCl₂

unklar ist - wie oben schon erwähnt -, kann die Aufgabe der 9%igen Kochsalzlösung hinreichend damit erklärt werden, daß sie der Wiederherstellung einer physiologischen Osmolarität dienen soll. Man erhält eine 0,9%ige und damit physiologische Kochsalzlösung, wenn man z.B. zu 9 Tropfen Wasser einen Tropfen 9%ige NaCl-Lösung zufügt. Nun könnte man sich denken, daß die in der hypotonischen Lösung aufgetriebenen, resistenteren Erythrozyten, die noch nicht geplatzt sind, im günstigeren Milieu wieder normale Gestalt annehmen, wenn das Wasser durch die Membran aus der Zelle herausdiffundieren kann.

zu b) der CPD-Stabilisator

Über diese Lösung liegen bei uns kaum Angaben vor, da im europäischen Bluttransfusionswesen hauptsächlich der ACD-Stabilisator, Formel B, Verwendung findet. Nach BYRDY und ZABLOCKA hat der Stabilisator folgende Zusammensetzung:

C = Citronensäure p.A.	2,77 g
+ Trinatriumcitrat-2-hydrat	26,16 g
P = Na-Dihydrogenphosphat·H ₂ O	2,18 g
D = Dextrose (H ₂ O-freie Glukose)	25,00 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 g
pH 5,75	
70 ml Stabilisator/500 ml Blut	

Demgegenüber enthält der

ACD-Stabilisator, Formel B, (SPIELMANN und SEIDL)

folgende Substanzen:

A = Acidum citric. 4,40 g

C = Natrium citricum neutrale • H_2O 13,20 g

D = Saccharum amylac. • H_2O (Dextrose)
14,70 g

Aqua pro injectione ad 1000,0 ml

pH 4-5

100 ml Stabilisator/400 ml Nativblut

Der Unterschied zwischen diesen Stabilisatoren besteht im Wesentlichen in den verschiedenen pH-Werten und darin, daß der CPD-Stabilisator Phosphat enthält. Außerdem wäre den Angaben von SPIELMANN und SEIDL zufolge der CPD-Stabilisator mit einem pH-Wert von 7,1 der physiologischere von beiden Puffern. (BYRDY und ZABLOCKA geben im Gegensatz dazu den pH-Wert des CPD-Stabilisators mit 5,75 an; eigene Messungen ergaben ebenfalls einen pH um 5,7).

Verwendet wird der CPD-Stabilisator in einigen Transfusionszentralen der USA. Welche Rolle der Stabilisator in Polen spielt, haben die Autorinnen nicht erwähnt. Dem Phosphat (allerdings in größeren Mengen als im CPD-Stabilisator enthalten) räumen SPIELMANN und SEIDL für die Zukunft eine größere Bedeutung ein, da es Einfluß auf die 2,3-DPG (Diphosphoglycerinsäure) und damit auf die O_2 -Affinität

zum Hämoglobin haben soll.

Zur Aufgabe der übrigen Stoffe im Stabilisator geben SPIELMANN und SEIDL an:

Citrationen zur Verhinderung der Gerinnung,
Dextrose zur Aufrechterhaltung des Zellstoff-
wechsels,

Citronensäure zur Neutralisation des infolge
von Hydrolyse basisch reagierenden Trinatrium-
citrats.

In den eigenen Versuchen wurde sowohl der
CPD- als auch der bei uns übliche ACD-Stabilisator,
Formel B, verwandt. Außerdem wurde die Wirkung eines
Zusatzes von AB-Serum geprüft, d.h. von sog. "gruppen-
freiem Serum" von Spendern der Blutgruppe AB, da
aufgrund der Erfahrungen bei anderen serologischen
Methoden zu vermuten war, daß sich die Blutkörperchen
gerade in diesem Medium gut erholen müßten.

2.6. VERDÜNNUNGSGRAD

Dieser war bei den Inkubaten mit Schnee nicht
sehr genau zu halten, entsprach aber damit Verhält-
nissen, wie sie in der Realität bei rechtsmedizinischen
Fällen zu erwarten sind.

Der Schnee wurde, wie schon unter 2.1. ausge-
führt, mit einem kleinen Labormeißel abgemessen.
Nach dem Auftauen wurde bei jedem Inkubat mit
einer Pasteur-Pipette die Tropfenzahl bestimmt

(siehe auch unten die Randzahlen in den Auswertungstabellen).

2.7. TECHNIK DER AUSWERTUNG

Ausgewertet wurde auf Objektträgern. Zunächst wurde je 1 Tropfen Anti-A, Anti-B und Anti-AB-Serum aufgetragen. Daneben kam je ein kleiner Tropfen (etwa $\frac{1}{4}$ der Antiserummenge) des Zellsediments oder Hämolysats, dessen Blutgruppe identifiziert werden sollte. Nach Vermischen der Reaktionspartner mit einem Glasstäbchen, wurde der Objektträger bis zum Reaktionseintritt leicht hin und her gekippt. Beurteilt wurden die Agglutinate sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch bei 125facher Vergrößerung. Zur mikroskopischen Beurteilung wurden die Agglutinate auf den Objektträgern mit Deckgläsern abgedeckt, um möglichst gleichmäßig dicke und transparente Präparate zu erhalten. (Weitere Einzelheiten s.u. bei der Schilderung der Versuche selbst ab Ziffer 3).

3. EIGENE VERSUCHE

3.1. VORVERSUCHE

3.1.1. VERSUCHSANORDNUNG

Die Vorversuche wurden -wie bereits erwähnt- mit Aqua bidest. ausgeführt. Gegenüber dem Schneegeschabsel hatte es für den Anfang den Vorteil der leichteren Beschaffbarkeit und Handhabung und gestattete dennoch, erste Erfahrungen und Ergebnisse für die eigentlichen Versuche mit Schnee zu sammeln.

Insgesamt wurden vier Versuchsansätze mit Aqua bidest. gemacht. Der erste Versuch, mit allerdings bereits 9 Tage alten Erythrozyten und bei Zimmertemperatur ausgeführt, ergab, daß die roten Blutkörperchen resistenter waren als erwartet. Erst ab der Aqua bidest.-Verdünnung von $1:4 = 1+3$ wurden die Agglutinate unsicher und mit dem nächsten Verdünnungsgrad $1:5 = 1+4$ war überhaupt keine Reaktion mehr zu erhalten (sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch). Gab man jedoch zu dem letzten Versuchsansatz hypertonische Lösung (h.L.), so erhielt man wieder eindeutige Agglutinate.

Um festzustellen, ob dieser Effekt auf der Wiederherstellung des physiologischen Milieus beruhte oder auf einer unspezifischen Reaktion, wurden folgende Versuche angeschlossen:

a) Statt mit Aqua bidest. wurde das Blut mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt:

36 Tropfen 0,9%ige NaCl

9 Tropfen Citratblut der Gruppe A₁

4 Tropfen hypertonische Lösung.

Die sich erg. ebenden Agglutinate waren auch hier mit h.L. stärker als diejenigen ohne h.L.!

b) Darauf wurde dieser Versuch wiederholt; aber zur Kontrolle des Versuchs a) den Erythrozyten Eigenserum statt Antiserum zugegeben, z.B. A₁-Blut mit Anti-B inkubiert. Diesmal trat keine Agglutination auf!

Bewerten könnte man dieses Resultat so, daß h.L. zwar keine unspezifische Reaktion verursacht, wohl aber eine unspezifische Intensivierung der Reaktion zwischen Antikörper und Antigen bewirkt, da es nicht nur bei Verdünnung mit Aqua bidest. sondern auch mit NaCl-Lösung zu verstärkter Agglutinationsreaktion kam.

Wiederholt wurde der Versuch mit frischem Blut. Die Resistenz gegen Aqua bidest. von Zimmertemperatur bestätigte sich erneut.

Da auf das Überleben der Erythrozyten nicht nur die Verdünnungsstufe einen Einfluß hat sondern auch die Temperatur, wurden Versuche bei -7°C im Gefrierfach des Kühlschranks angeschlossen. Es handelte sich dabei um den Versuchsansatz 2 mit Blut der Gruppen A₁, B und O.

Jeder Versuchsansatz sollte, wenn irgend möglich, gleichzeitig Blut der Gruppen A₁, B und O umfassen. Um die Ansätze hinterher identifizieren zu können, wurden die frisch von der Blutbank kommenden Probenröhrchen mit einer Nummer versehen. Dabei bekam jeder aus A₁, B und O bestehende Satz dieselbe Nummer. Zur Verdeutlichung folgendes Beispiel: Stellte die Blutbank am selben Tag zwei Proben A₁-Blut, zwei Proben B-Blut und zwei Proben Blut der Gruppe O zur Verfügung, so ergaben diese 6 Blutproben zwei Versuchsansätze z.B. mit den Nummern 6(A₁, B, O) und 7(A₁, B, O).

Jeder Versuch wiederum bestand aus meistens 12 Einzelansätzen:

Blutproben der Gruppe A₁, B, O zur Auswertung

ohne Zusatz,

" " " " mit CPD,

" " " " mit h.L.,

" " " " mit h.L. + CPD.

Dazu kamen bei einigen Ansätzen der Hauptversuche (s.dort) noch Probenserien zur Auswertung mit ACD, gruppenfreiem Serum und unterschiedlichen Expositionszeiten.

Die Auswertung der Agglutinate von Versuch 2 nach 2,5 h Inkubation zeigte

a) die Agglutinationsreaktionen mit dem Ansatz ohne Zusatz fielen nur schwach aus;

b) die Agglutinate unter CPD-Zusatz unter-

schieden sich kaum von denen ohne Zusatz;

c) bei Zugabe von h.L. waren die Agglutinate verstärkt, falschnegative Resultate traten nicht mehr auf;

d) vergleicht man die Resultate nach Zusatz von h.L. allein mit denen nach Zusatz von h.L. plus CPD, so ist kaum ein Unterschied zu finden (siehe Auswertungstabelle S.19).

Bewertung der Agglutinate:

- +++ großes Agglutinat mit Zerfall des Randsaumes
- ++ mittelgroße Agglutinate
- + kleine Agglutinate
- + - gerade noch sichtbare Agglutinate
- ? fragliche Agglutinate
- keine Agglutinate
- +⁺ hochgestelltes + = eine 1/2 Stufe höherer Titer

Einen Tag lang waren versuchsweise lediglich die 2 B-Erythrozyten inkubiert worden. Die Ergebnisse mit und ohne h.L. fielen noch weniger eindeutig aus. (Auf die tabellarische Darstellung in allen Einzelheiten wird hier, genau wie bei späteren Versuchen mit wenig voneinander differierenden Ergebnissen, verzichtet. Die aufgeführten Tabellen sind als exemplarisch auch für andere Versuche mit ähnlichem Resultat zu betrachten).

Bei Auswertung der Proben 2(A₁, B und O) nach Inkubation von 3 Tagen bei -7°C in Aqua bidest.

sahen die Ergebnisse gänzlich anders aus. Die Form der Blutkörperchen blieb unabhängig von den Zusätzen trotz der langen Inkubationszeit fast unverändert. Ebenso ergab sich kein Unterschied, weder makroskopisch noch mikroskopisch, in der Stärke der Agglutinate mit und ohne Zusatz; d.h. eine Wirkung der Zusätze auf die Agglutinate war im Gegensatz zu den Versuchen bei Zimmertemperatur und bei Inkubation für 2,5 h bei -7°C nicht festzustellen. Auffällig war bei der Auswertung dieser Inkubate auch, daß unspezifische Agglutinate mit dem Blut der Gruppe O vorkamen. Das Aussehen der Agglutinate wich außerdem vom Normalen ab. Man könnte sie - jedenfalls makroskopisch - als weißliche Schollen bezeichnen (siehe Tabelle 2).

TABELLE 1

AUSWERTUNG DER INKUBIERTEN BLUTPROBEN 2A₁, 2B, 20
NACH 7,5 h BEI -7°C IM KÜHLSCHRANK;
VERDÜNNUNG 1+4;

ma= MAKROSKOPISCH; mi= MIKROSKOPISCH; h.L.= HYPERTONISCHE
LÖSUNG; UNTERSTRICHEN SIND DIE VERGLEICHE OHNE ZUSATZ
GEGEN h.L., CPD, BZW. h.L. ALLEIN GEGEN CPD+h.L.

A) INKUBATE OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
	ma/mi	ma/mi	ma/mi
2A ₁	..-/-..	-/-	.. [?] /+.-
2B	-/-	..+/-+.	..-/-..
20	-/-	-/-	-/-

B) INKUBATE MIT 1 TR. CPD (= 0,14:1 ml BLUT)

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
2A ₁	.. [?] /+..	-/-	..-/- [?]
2B	-/-	..+/-+.	..-/-..
20	-/-	-/-	-/-

C) INKUBATE MIT 4 TR. h.L. (36:4=9:1)

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
2A ₁	.. [?] /+.-	..-/-.	..+/-+.
2B	-/-	..+/-+.	..+/-+.
20	-/-	-/-	-/-

D) INKUBATE MIT 4 TR. h.L. + 1 TR. CPD

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
2A ₁	+ -/-	-/-	+ ⁺ /++
2B	-/-	+ ⁺ /++	+ -/+
20	-/-	-/-	-/-

TABELLE 2

AUSWERTUNG DER INKUBATE 2 (A₁,B,O) NACH 3 TAGEN BEI -7°C
(AQUA BIDESt.,VERDÜNNUNG 1+4 = 36 TR. AQUA + 9 TR.
CITRATBLUT)

A) INKUBATE OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
	ma/mi	ma/mi	ma/mi	(*)=weißlich- scholliges Aus- sehen d.Agglutinate
2A ₁	-/-	*2/+	2/-	
2B	-/-	-/+	-/-	
2O	*+/-	+/-	-/-	

B) INKUBATE MIT 1 TR.CPD

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
2A ₁	+ -/ 2	-/-	/	Aussehen d.Ery- throzyten wie ohne Zusatz
2B	-/-	-/+ -	/	
2O	-/-	-/-	/	

C) INKUBATE MIT 4 TR. h.L.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
2A ₁	-/-	+/+	+/+	Die Erythro- zytenform hat sich nicht verbessert
2B	-/-	+/+*	+ -/+	
2O	-/-	-/-	/	

D) INKUBATE MIT 4 TR. h.L. + 1 TR. CPD

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
2A ₁	+ -/+ -	-/-	/	
2B	-/-	+/+*	/	
2O	-/+ -	-/-	/	

Die Agglutinationsreaktion mit ANTI-AB könnte bei
B) und D) nicht ausgeführt werden, da von dem Anti-
serum nicht mehr genügend vorhanden war.

3.1.2. BEWERTUNG DER ERSTEN ERGEBNISSE

1) Die Resistenz der Erythrozyten gegenüber einer Verdünnung der Blutprobe mit Aqua bidest. ist, mindestens bei Zimmertemperatur, größer als nach der Vorinformation zu erwarten.

2) Das Aussehen der roten Blutkörperchen wird bei Verdünnung und Kälteeinwirkung von -7°C im Gegensatz zu den Angaben von BYRDY und ZABLOCKA durch keinen der empfohlenen Zusätze verbessert.

3) Auch der Einfluß der Zusätze auf die Agglutination ist nach längerer Exposition - auch bei Temperaturen, die höher sind als -10°C - nicht nachweisbar.

4) Die gewählten Tropfenmengen haben sich aus folgenden Gründen bewährt: Die Ausgangsmenge von 9 Tropfen Citratblut liegt in der von BYRDY und ZABLOCKA angegebenen Größenordnung. Außerdem wird bei dieser Tropfenzahl die Abmessung der Zusätze einfacher. Bei einer Verdünnung von z.B. 1:2 (1+1) mit 9 Tropfen Aqua bidest. kann durch einen Tropfen h.L. ein physiologisches Milieu erzielt werden. Analog erhält man bei Zugabe von 1 Tropfen CPD-Stabilisator ungefähr die nach BYRDY und ZABLOCKA anzustrebende Relation von 0,14 ml CPD : 1 ml Blut.

3.2. HAUPTVERSUCHE:

ERMITTLUNG DER OPTIMALEN TECHNIK UND GRENZEN IHRER LEISTUNGSFÄHIGKEIT

In diesem Abschnitt werden die 25 Versuche mit Schnee beschrieben.

Der erste Versuch, bei dem eine Inkubation in Schnee bei -7°C vorgenommen wurde, diente noch der Orientierung. Da das Blut bereits 2 Tage alt war (in den folgenden Versuchen wurde nur frisches verwendet), wunderte es nicht, daß die Erythrozyten des Ansatzes, der ohne Zusatz aufgetaut war, total hämolytisch waren, und die Agglutinationsreaktionen nicht mehr interpretiert werden konnten.

Nicht anders sah das Ergebnis mit CPD-Zusatz aus. Das Mikroskopbild des Inkubates, dem h.L. zugegeben worden war, wies jedoch fülligere, plastischere Erythrozyten auf. Sie waren blaß aber normal geformt. Das Gleiche ergab sich bei h.L. plus "CPD. Auf die Eindeutigkeit der Agglutinationsreaktionen hatten die Zusätze jedoch auch hier keinen Einfluß. Die Proben konnten auch mit diesen Zusätzen nicht diagnostiziert werden.

Das eben beschriebene Ergebnis ist deshalb so bemerkenswert, weil es das "Phänomen der plastischen Erythrozyten", das von BYRDY und ZABLOCKA beschrieben wurde, zu bestätigen scheint. Wie aber weitere Versuche ergaben, war es nur eines

von zwei Inkubaten, die sich überhaupt so verhielten. Damit ist dieses Ergebnis die Ausnahme und nicht die Regel! Voraussetzung dafür dürften besonders resistente Erythrozytenpopulationen sein. Als dieses Phänomen das zweite Mal auftauchte, konnte nämlich beobachtet werden, daß die Erythrozyten der betreffenden Blutgruppe von vornherein besser erhalten aussahen als die der beiden anderen gleichzeitig inkubierten.

Bei den eigentlichen Hauptversuchen mit Eisgeschabsel wurde gemäß den Ergebnissen der Vorversuche zunächst ebenfalls beabsichtigt, mit dem Verdünnungsgrad von ungefähr 1:4 (1+3) zu arbeiten. Als bei der Auswertung die Tropfenzahl des geschmolzenen Inkubates ermittelt wurde, zeigte sich allerdings, daß die Verdünnung nicht größer war als 1:3 (1+2). Gedauert hatte dieser Versuch 3 (A₁, B, O) 20 h, die Temperatur hatte -7°C betragen. Der Einfluß von CPD und h.L. erwies sich als genau so groß oder so gering wie beim letzten Aqua bidest.-Versuch mit B-Blut. Die Agglutinate waren nicht so beschaffen, wie es sonst bei Frischblut der Fall ist: Man könnte sie wieder als weißlich-fettige Schollen beschreiben, die auch bei den mitgeführten Kontrollen auftraten.

Als Kontrollen auf unspezifische Antigen-Antikörperreaktionen dienten die Blute der Gruppe O, sowie die Reaktion jeder Blutgruppe mit ihrem

Eigens serum, d.h. Blut der Gruppe B wurde auch mit Anti-A geprüft (vgl. die Auswertungstabellen). Um auszuschließen, daß Fehlreaktionen durch die Antiseren bedingt sein konnten, diente als Kontrolle noch zusätzlich eine 5%ige Suspension des übriggebliebenen und bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrten Erythrozytensediments. Zur Verdeutlichung des eben Gesagten möge das Auswertungsschema von Versuch 4 dienen (vgl. Tabelle 3). Auf die Darstellung der Ergebnisse von Versuch 3 wird hier verzichtet, da sie denen von Versuch 4 weitgehend gleichen. Die Ergebnisse von Versuch 3 waren nicht besonders zufriedenstellend; - jedenfalls gemessen an den Resultaten von BYRDY und ZABLOCKA -, so daß versucht wurde, die Fehlerquelle zu finden.

3.2.1. ZULÄSSIGE SCHNEEMENGE

Zunächst wurde nach Abweichungen in der eigenen Versuchsanordnung gegenüber der von BYRDY und ZABLOCKA gesucht. Der Verdacht fiel auf den Verdünnungsgrad. Die nächsten Ansatzserien 4 und 5 wurden nur noch mit einem Löffel Schnee (entsprechend etwa 10 Tropfen Wasser) inkubiert; damit wurde die niedrigste Verdünnungsstufe gewählt. Inkubiert wurde wieder bei -7°C für 20 und 48 h; die Zusätze waren wieder CPD, h.L. und CPD plus h.L. - und die Ergebnisse genauso schlecht (vgl. das

bereits erwähnte Reaktionsschema in Tabelle 3)!

An den Antiseren konnte es nicht liegen, da die Kontrollen mit den bei normalen Kühlschranktemperaturen aufbewahrten (A_1, B, O)-Erythrozyten des Versuches 4 in Ordnung waren. Die gleichen Erfahrungen wurden mit der Versuchsserie 5 gemacht.

TABELLE 3

AUSWERTUNG DER VERSUCHSSERIE 4 NACH 20 h INKUBATION BEI -7°C .
DIE ZAHLEN HINTER DEN AUSWERTUNGEN BEDEUTEN DIE TROPFEN-
ZAHLEN DES INKUBATES. DA DAVON 9 TROPFEN BLUT SIND, BE-
TRÄGT DIE VERDÜNNUNG HIER ALSO ETWA 1+1.

A) INKUBAT OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
	ma/mi	ma/mi	ma/mi	
4A ₁	+ -/+ -	? /-	+ [*] /++	13 Tr.
4B	-/-	+/+	+ [*] /++	18 "
40	-/-	-/+ -	? /+	14 "

Die Kontrollen innerhalb der Inkubateguppen sind unter-
strichen!

B) MIT 1 TROPFEN CPD/INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
4A ₁	-/-	? +/+	+ [*] /++	17 Tr.
4B	-/-+	+/+	+/ [*] +	21 "
40	-/-	-/+ -	? +/+	16 "

C) MIT 1 TROPFEN h.L./INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
4A ₁	-/-	? /+	+/ [*] +	16 Tr.
4B	-/-	+/+	+ -/+	21 "
40	-/-	-/+ -	-/+	19 "

D) MIT 1 TROPFEN h.L.+1 TROPFEN CPD/INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
4A ₁	-/-	? /+	+/ [*] +	19 Tr.
4B	-/-	+/+	+/+	18 "
40	-/-	-/+ -	? /+	19 "

TABELLE 3 FORTSETZUNG

KONTROLLE 4A₁, 4B, 4O bei +6°C 2 TAGE ALS ERYTHROZYTEN-
SEDIMENT AUFBEWAHRT; 5%ige SUSPENSION IN 0,9%iger NaCl-
LÖSUNG, JEWEILS FRISCH ANGESETZT.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
4A ₁	+/+	-/-	+/+
4B	-/-	+/+	+/+
4O	-/-	-/-	-/-

AUSWERTUNG DER VERSUCHESSERIE 4 NACH 48 h BEI -7°C

A) OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
	ma/mi	ma/mi	ma/mi	
4A ₁	-/+ -	-/+ -	-/+ -	15 Tr.
4B	-/+	+ -/+	+ -/+	15 "
4O	-/+	-/+ -	-/+	15 "

B) MIT 1 TROPFEN CPD/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
4A ₁	-/+ -	+/+	?/+	75 Tr.
4B	+/+	+/+	+/+	13 "
4O	-/+ -	+ -/-	+ -/-	18 "

C) 1 Tr. h.L./RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
4A ₁	?/+ -	+ -/+	+ -/+	22 Tr.
4B	?/+ -	+/+	+ -/+	15 "
4O	+ -/+	+ -/-	+/+	17 "

D) 1 Tr. h.L. + 1Tr. CPD/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
4A ₁	?/+ -	+ -/+	+ -/+	18 Tr.
4B	ausgefallen (zu wenig Blut zum Inkubieren)			
4O	?/+ -	+ -/+	+ -/+	18 Tr.

3.2.2. EIGNUNG DER ZUSÄTZE

Um eine weitere Möglichkeit wahrzunehmen, wurde für die Versuchsreihe 7, die gleichzeitig mit Versuchsreihe 6 inkubiert wurde, statt CPD- ACD-Stabilisator, Formel B genommen und außerdem die Wirkung von AB-Serum ausprobiert. Die Inkubationszeit betrug 22 h, die Temperatur für diesen Zeitraum lag zwischen -7 und -9°C .

Das Resultat waren ein makroskopisch völlig hämolytischer Ansatz und für eine Identifizierung nicht verwertbare Agglutinate. Die Ergebnisse mit ACD waren kaum anders als die mit CPD. Da die Zusammensetzung der Stabilisatoren nicht so grundverschieden ist, war das auch nicht anders zu erwarten. Genausowenig brachte die Zugabe von AB-Serum eine entscheidende Verbesserung. Die mikroskopische Kontrolle bestätigte den makroskopischen Eindruck (siehe Tabelle 4 und 4 Fortsetzung).

3.2.3. OPTIMALE TEMPERATUR

Da die Versuche bei -7°C keine brauchbaren Resultate ergeben hatten, wurde in den folgenden Versuchen systematisch ausprobiert, bei welcher Temperatur noch ein verwertbares Ergebnis zu erzielen war.

Die nächste Erythrozytenserie wurde so inkubiert,

TABELLE 4

AUSWERTUNG VON VERSUCH 6 UND 7 NACH 22 h BEI INKUBATION
ZWISCHEN -7°C UND -9°C.

1a) OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
	ma/mi	ma/mi	ma/mi
6A ₁	-/+ -	-/-	-/+ -
6B	-/+ -	-/+ -	-/+ -
60	-/-	-/+ -	-/+

1b) 1Tr.CPD/INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
6A ₁	-/+	-/-	-/+
6B	? /-	+ /+ -	? /+ -
60	-/-	- /+ -	-/-

1c) 2Tr. h.L./INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
6A ₁	+ -/+	-/-	+ /+
6B	-/-	-/-	- /+ -
60	- /+ -	- /+ -	-/-

1d) 2Tr. h.L. + 1Tr.CPD/INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
6A ₁	-/+	- /+ -	+ /+
6B	- /+ -	- /+	- /+
60	- /+ -	-/-	- /-

2a) OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
7A ₁	- /+	- /+	+ /+
7B	- /+	- /+	+ - /+
70	- /+ -	-/-	- /-

TABELLE 4 FORTSETZUNG

2b) 2Tr.ACD/INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
	ma/mi	ma/mi	ma/mi
7A ₁	+ -/-	-/+ -	+ /+
7B	+ -/-	+ /+ ⁺	- /+
70	- /+ -	- /-	- /-

2c) 2Tr.h.L./INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
7A ₁	- /+ -	- /+	+ /+
7B	? /+ -	- /+	- /+
70	+ - /+ -	- /-	- /-

2d) 2Tr. h.L.+ 2Tr. ACD/INKUBAT

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
7A ₁	- /+ -	- /+ -	+ /+
7B	? /+	+ /+	+ /+ ⁺
70	+ /+	- /-	- /-

-ACD:BLUT=1:4

dagegen CPD:BLUT=1:7,1

3a) 5Tr.AB-SERUM/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
6A ₁	? /+	- /+	+ /+
	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
7A ₁	- - /+	- /+	+ /+

3b) 5Tr.AB-SERUM+ 1Tr.h.L./RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
6A ₁	- /+	- /-	+ /+
	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
7A ₁	- /?	- /-	+ /+

daß der Schnee gerade nicht schmolz. Bei Inkubationsbeginn zeigte das Thermometer -2°C . Zunächst wurde der Versuch nur für 22 h angesetzt. Die Verdünnung war ungefähr 1+1, außerdem wurden sämtliche Zusätze, die zur Verfügung standen, getestet.

Die Erythrozyten der Ansätze waren bei mikroskopischer Beurteilung noch sehr gut erhalten. Sie unterschieden sich kaum von den bei $+4$ bis $+6^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Kontrollen. Makroskopisch war in den Röhrchen ein Bodensatz mit hämolytischem Überstand zu sehen. Die Agglutinationsreaktionen waren sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch, - gleichgültig ob mit oder ohne Zusätze - eindeutig ablesbar. Unspezifische Agglutinate gab es nicht, wenn man von der Geldrollenbildung der O-Blutkörperchen und der Eigenkontrollen (z.B. B-Zellen inkubiert mit Anti-A) absieht. Erfassbar waren sie nur mikroskopisch; auffällig stark erschienen sie in den Ansätzen mit h.L. als Zusatz.

Die Inkubate mit AB-Serum hatten eine dickflüssige, brombeersaftfarbige Beschaffenheit (zur Auswertung siehe Tabelle 5).

Die nächsten Versuchsansätze der Serie 9 und 10 wurden, um das Ergebnis abzusichern, bei den gleichen Temperaturverhältnissen gemacht. Die bei Versuch 8 gewonnenen Ergebnisse bestätigten sich (einschließlich die der Geldrollenbildung).

Auch die Auswertung der Serie 10 nach 44 h

brachte gleichgute Agglutinate mit gleichermaßen gut erhaltenen Erythrozyten; makroskopisch war in den Röhrchen hämolytischer Überstand über einem Bodensatz zu sehen.

Die nächste Temperaturstufe war -4°C . Inkubation der Versuchsreihen 11 und 12; Auswertung nach 23 h. Die Agglutinate erschienen noch gut sichtbar und eindeutig; allerdings waren die roten Blutkörperchen nicht mehr so gut erhalten. Dazu war eine verstärkte Geldrollenbildung bzw. Agglutinationsneigung zu bemerken. Die Zusätze bewirkten gegenüber dem Ansatz ohne Zugabe keine besseren Ergebnisse.

Nichts wesentlich anderes zeigte die Auswertung nach 45 h Inkubation der Versuchsserien 11 und 12.

Die Serien 13 und 14, die zunächst bei -4°C inkubiert wurden, sollten den Bereich zwischen -4 und -6°C zu untersuchen gestatten. Da aber der Kühlschrank versagte, wurde unbeabsichtigt noch einmal bei -2 bis -4°C inkubiert.

Den Temperaturbereich zwischen -5 bis -7°C zu erfassen, bereitete Schwierigkeiten, da die Einstellmöglichkeiten des Kühlschranks begrenzt waren.

Die Versuchsserie 17 (A_1, B, O), ausgewertet nach 22 und 45 h bei ungefähr -6 -7°C , ergab makroskopisch blasse, schollige Agglutinate (vgl. das Ergebnis der ersten Versuche). Mikroskopisch waren blasse und nur noch wenige erhaltene Erythrozyten zu sehen. Außerdem waren die Agglutinate unspezifisch, da die

O-Blutkörperchen mit Anti-A, Anti-B und Anti-AB reagierten. Wiederum konnten weder die hypertonische Lösung noch das AB-Serum etwas am Aussehen von Erythrozyten und Agglutinaten ändern. Wenn Unterschiede vorhanden waren - es schien dies mit AB-Serum der Fall zu sein - dann waren sie so minimal, daß sie auch bei mikroskopischer Betrachtung nicht sicher zu objektivieren waren.

Die Ansätze bei Temperaturen unter -7°C waren überhaupt nicht mehr sicher zu identifizieren (Ansätze 6 und 7 sowie Blindversuche). Keine der Proben ergab mehr ein verwertbares Agglutinat.

3.2.4. NACHWEISDAUER

Zum Schluß sollte noch der Zeitraum abgesteckt werden, innerhalb dessen die Gruppenbestimmung möglich ist. Für den Bereich bis -5°C ergab sich als Grenzwert die Dauer von vier Tagen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben total hämolytisch und es traten zunächst nur mikroskopisch feststellbar- falschpositive Agglutinationsreaktionen auf. Die Erythrozytenstruktur fing an, krümelig-schollig zu werden (Versuche 20-23 siehe Tab. 6 und 7).

Das A-Blut der Versuchsserie 23 enthielt bei der Auswertung nach vier Tagen die zweite Erythrozytenpopulation, die das "Phänomen der plastischen Erythrozyten" aufwies (vgl. 3.2. Hauptversuche) nachdem h.L.

dazugegeben worden war. Der Unterschied zu den Erythrozyten im Inkubat ohne Zusatz muß wirklich als bemerkenswert bezeichnet werden. Die vorher schon recht lädierten roten Blutkörperchen bekamen eine ganz klar konturierte Gestalt. Es muß allerdings gesagt werden, daß sie im Mikroskoppräparat spärlicher erschienen, als die Zellen in den Kontrollversuchen mit den bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Blutproben.

Für die Temperatur zwischen -5 und -7°C war die Nachweisdauer nur kurz: spätestens nach 2 Tagen war mit falschpositiven Agglutinaten zu rechnen.

Bei Temperaturen tiefer als -7°C ist schon nach einem Tag komplette Hämolyse entstanden; erkennbare Agglutinationsreaktionen gab es nicht mehr (vgl. u. a. die Blindversuche).

TABELLE 5

AUSWERTUNG DER INKUBATION 8 (A₁, B, O) NACH 22 h BEI -2°C

a) OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>		
	ma/mi	ma/mi	ma/mi		
8A ₁	+/+	-/- [⊗]	+/+ ⁺	20 Tr.	⊗ = GELD-
8B	-/- [⊗]	+/+	-/+ ⁺	16 Tr.	ROLLENBILDUNG
8O	-/-	-/-	-/- [⊗]	20 Tr.	

b) 2 Tr. AB-SERUM/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>		
	ma/mi	ma/mi	ma/mi		
8A ₁	++++	-/- [⊗]	+/+	24 Tr.	WENIGER STARKE
8B	-/- [⊗]	+/+	+/+	23 Tr.	GELDROLLEN
8O	-/- [⊗]	-/- [⊗]	-/- [⊗]	20 Tr.	ALS BFI a)

c) 2 Tr. h.L.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>		
	ma/mi	ma/mi	ma/mi		
8A ₁	++++	-/-	+/+	16 Tr.	SOFORT GELD-
8B	-/-	+/+	+/+	25 Tr.	ROLLEN-
8O	-/-	-/-	-/- [⊗]	25 Tr.	BILDUNG

d) 2 Tr. AB-SERUM + 2 Tr. h.L.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>		
	ma/mi	ma/mi	ma/mi		
8A ₁	++++	-/-	+/+	21 Tr.	STÄRKSTE
8B	-/-	+/+	+ ⁺ +/+	27 Tr.	GELDROLLEN-
8O	-/-	+ -/- [⊗]	+ [⊗] -/-	25 Tr.	BILDUNG

TABELLE 5 FORTSETZUNG

e) 1 Tr. CPD/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
	ma/mi	ma/mi	ma/mi	
8A ₁	++/++	-/-	+/+	22 Tr.
8B	-/-	+/+	+/+	22 Tr.
80	-/-	-/-	-/-	24 Tr.

f) 1 Tr. CPD + 2 Tr. h.L.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
8A ₁	+/+	-/-	+/+	25 Tr. ÜBERALL
8B	-/-	+/+	+/+	22 Tr. GELDROLLEN-
80	-/-	-/-	-/-	20 Tr. BILDUNG

g) 2 Tr. ACD

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
8A ₁	+/+	-/-	+/+	19 Tr.
8B	-/-	+ -/+	+/+	21 Tr.
80	-/-	-/-	-/-	20 Tr.

h) 2 Tr. ACD + 2 Tr. h.L.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
8A ₁	++/++	-/-	+/+	20 Tr. GELD-
8B	-/-	-/-	++/++	22 Tr. ROLLEN
80	-/-	-/-	-/-	19 Tr.

TABELLE 6

AUSWERTUNG VON VERSUCHSSERIE 21 (A₁,B,O) NACH INKUPATION FÜR 70 h BEI -3,5°C

a) OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
	ma/mi	ma/mi	ma/mi	
21 A ₁	+/+	-/+ ^(H)	+/+	(H)=untypische Agglutinate
21 B	-/+ ⁽⁺⁾	+/-	+/-	
21 O	-/-	-/+ ^(H)	-/+ ⁽⁺⁾	

b) 10 Tr. AB-SERUM/RÖHRCHEN

DIE ANSÄTZE AUF DEN OBJEKTTRÄGERN GELIEREN BEI DEM HOHEN AB-ZUSATZ UND SIND DESHALB NUR BEDINGT ZU VERWERTEN!

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
21 A ₁	^(H) +/+	^(H) +/+	^(H) +/+
21 B	2/-	2/-	2/+ ⁽⁺⁾
21 O	2/+ ⁽⁺⁾	2/+ ⁽⁺⁾	2/+ ⁽⁺⁾

c) 1 Tr. h.L.

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
21 A ₁	+/+	-/-	+/+
21 B	-/-	+/+	+/+
21 O	-/-	-/-	-/+ ⁽⁺⁾

d) 10 Tr. AB-SERUM+1Tr.h.L.+1Tr.CPD

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
21 A ₁	⁽⁺⁾ +/+ ⁽⁺⁾	⁽⁺⁾ +/+ ⁽⁺⁾	⁽⁺⁾ +/+ ⁽⁺⁾
21 B	-/+ ⁽⁺⁾	⁽⁺⁾ +/+	⁽⁺⁾ +/+
21 O	-/+ ⁽⁺⁾	+ ⁽⁺⁾ /+ ⁽⁺⁾	+ ⁽⁺⁾ /+ ⁽⁺⁾

TABELLE 7

AUSWERTUNG VON VERSUCH 22(A₁,O)UND 23(A₁)NACH 93 h BEI -3°C
IN DIESEN ANSÄTZEN WURDE AUßERDEM VERSUCHT,DIE OPTIMALE
MENGE FÜR DIE AB-SERUM-ZUGABE ZU ERMITTELN.DAS ERGEBNIS
SAH SO AUS,DAß ALLE ZUGABEN >5TROPFEN LEDIGLICH ZU-
SÄTZLICH DIE GEFAHR DER GELIERUNG BEI DER AUSWERTUNG
BARGEN!

a) OHNE ZUSATZ

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
22A ₁	+ -/+ -	-/-	+ /+ +	die roten BK 23A ₁
22B	- /+ -	-/-	- /+ -	sehen besser er-
23A ₁	+ /-	? /-	? /+	halten aus als 22A ₁

b) 5 UND 7 Tr.(22A₁,23A₁)-AB-SERUM

-KEIN UNTERSCHIED IM AUSSEHEN DER EYTHROZYTEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
22A ₁	+ /+	- /+ -	+ /+
22B	- /+ -	-/-	? /+ -
23A ₁	? /+ -	? /+	+ /+

c) 1 Tr.h.L./RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
22A ₁	Anti-	- /+ -	+ -/-	(+) die 23A ₁ -Erythro-
22B	serum ist	-/-	- /+ -	zyten sehen viel
(+) <u>23A₁!</u>	aufge-	-/-	+ -/+	" klarer aus als ohne
	braucht			h.L.bzw.bei 22!

d) 5 Tr.AB-SERUM+1Tr.h.L.(22A₁)/7Tr.AB-SERUM+1Tr.h.L.(23A₁)

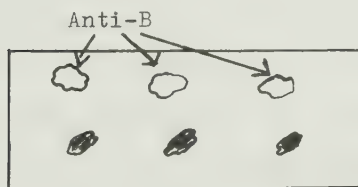
	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
22A ₁		-/-	+ -/-	(+) wie unter c) ganz
22B		-/-	- /+ -	klar konturierte
(+) <u>23A₁!</u>		-/-	+ -/-	wenn auch <u>wenige</u>
				Erythrozyten

3.2.5. EINBEZIEHUNG DES BLUTSPURENÜBER- STANDES IN DIE UNTERSUCHUNG

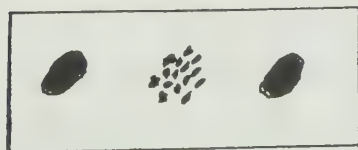
Es wurde erstmals bei der Auswertung der Versuchsserien 13 und 14 überlegt, auch den hämolytischen Überstand der Inkubate zur Identifikation zu nutzen. Die bei Temperaturen zwischen -2 und -4°C angesetzten Inkubate bestanden nach dem Auftauen alle aus einem Bodensatz und einem hämolytischen Überstand. Warum sollte es daher nicht möglich sein, den Überstand abzupipettieren, und als Antiserum zu benutzen, um damit die Serumgegenprobe zu machen? - Z.B. wurde der Überstand des A-Blutes der 14. Versuchsreihe mit frischen Kontrollerythrozyten der Eigenschaften A_1 , B und O geprüft. Folgende Reaktion war zu erwarten:

Serumgegenprobe

Reaktionsschema auf dem Objektträger:



A_1 B O - 5%ige Testerythrozyten-
suspension - Vermischen und Ablesen der Re-



aktion makr. und mikr.
nach frühestens 2 Min.

Bei positiver Gegenprobe sind Agglutinate als Reaktion von Anti-B mit B-Kontrollerythrozyten vorhanden. Tatsächlich gelang es, wenn auch nur mikroskopisch, die Serumeigenschaften nachzuweisen.

Wie weitere Versuchsserien ergaben, durfte der Verdünnungsgrad des Überstandes jedoch nicht größer als 1+1 sein, da sonst der Antikörpertiter zu niedrig war, um ein sicheres Ergebnis zu garantieren.

3.2.6. UNTERSCHIEDLICHE BEHANDLUNG DES ZELLEDIMENTES

Weiter wurde versucht, die Bestimmung der Blutkörpercheneigenschaften der Inkubate zu verbessern. Dreierlei Vorgehen wurde verglichen:

a) Primär angewandte Technik: hämolytischer Überstand und Bodensatz, wie er beim Auftauen entsteht, wenn man die Röhrchen ruhig stehen läßt, wurden durchmischt und gegen das Antiserum aufgetropft; die Größenverhältnisse von Antiserumtropfen zu Inkubatsuspensionstropfen betragen 1 : 1/2. Die dabei entstehenden Agglutinate waren in dem Temperaturbereich bis -5°C eindeutig.

b) 1. Modifikation: Vom Bodensatz wurde eine 5%ige Suspension in 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Dazu wurde die Spitze der Pasteur-Pipette in das Sediment am Röhrchenboden getaucht, ein Tropfen entnommen und dieser in NaCl-Lösung suspendiert. Auf dem

Objektträger wurden gleichgroße Tropfen Antiserum und Suspension aufgebracht. Die Agglutinate waren sämtlich schwächer und unsicherer als bei a).

c) 2. Modifikation: Der Bodensatz selbst wurde zur Agglutinationsreaktion verwandt und mit einem großen Tropfen Antiserum vermischt. Abgelesen wurde frühestens nach 2 Min. Die hier erzielten Ergebnisse waren am besten.

Natürlich kommt diese Technik nur dann in Frage, wenn noch ein Bodensatz vorhanden ist.

3.2.7. BLINDVERSUCHE

Sie dienten dazu, die in den bisherigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse abzusichern (Ansatzserien 24, 26, 28, 30).

Dazu wurden vor einer zweiten Person die Originalröhrchen von der Blutbank mit den Proben der Gruppen A₁, B und O vor der Inkubation umgefüllt in Röhrchen, die vorher gemäß der Anzahl der Blutgruppen mit I, II und III beschriftet worden waren. Bei der Inkubation war daher der Untersucherin nicht bekannt, welche Ziffer welcher Blutgruppe entsprach. Erst nach Abschluß des Versuches wurde der Schlüssel bekanntgegeben.

Der erste Blindversuch (Ansatz 24) fand bei -3°C statt und konnte nach 21 h eindeutig, nach 94 h (4 Tagen) unsicher und unabhängig von den Zusätzen identifiziert werden (siehe Tabelle 8).

Wiederholt wurde der Versuch bei der gleichen Temperatur, aber mit der doppelten Schneemenge (Versuchsreihe 26). Nach 22,5 h war die Identifizierung noch eindeutig; nach 2 Tagen gab es auch hier unklare Befunde.

Bei Temperaturen zwischen -2 und -10°C wurden die Proben des Blindversuchs 28 inkubiert und zwar sowohl mit dem Verdünnungsgrad 1+1 als auch 1+2. Bereits nach 22 h war die Interpretation der Agglutinate unsicher. Dabei war die Probe mit der Verdünnung 1+2, deren Auswertung vor der mit der Verdünnung 1+1 erfolgte, praktisch nicht identifizierbar (Tabelle 9).

Die Testserie 30 wurde wieder bei der Zwischentemperatur von $-4,5$ bis $-5,5^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Sowohl die Verdünnung 1+2 als auch die geringere von 1+1 ergaben falschpositive und falschnegative Reaktionen. Identifiziert werden konnten die Proben mit der Verdünnung 1+1 lediglich über die Serumgegenprobe. Nach 48 h bei -5°C war auch dieses nicht mehr möglich. Sie auf den Ansatz 30 I, der einen kleinen Bodensatz aufwies, waren die Inkubate sämtlich total hämolytisch.

TABELLE 8

AUSWERTUNG DES BLINDVERSUCHES 24(I,II,III) NACH 21 h
BEI -3°C

a) OHNE ZUSÄTZE

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
	ma/mi	ma/mi	ma/mi	
24 I	++/++	-/-	+/+	: -A-BLUT
24 II	-/-	-/-	-/-	: -O-BLUT
24 III	-/-	+ -/+	+/+	: -B-BLUT

ALLE INKUBATE BESTEHEN AUS BODENSATZ+ÜBERSTAND

SERUMGEGENPROBE

ÜBERSTAND VON: KONTROLLERYTHROZYTEN (25):

I	-	A ₁	-/-	B	-/+	O	-/-
II	-	A ₁	-/+	B	-/+	O	-/-
III	-	A ₁	-/+	B	-/-	O	-/-

DARAUS FOLGT: I HAT ANTI-B, II ENTHÄLT ANTI-AB UND
III ANTI-A; s.o."

b) 5 Tr. AB-SERUM/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
24 I	++/++	-/-	+/+	(x)
24 II	-/-	+ ^(x) /+-	+ ^(x) /-	BEI AB-ZUSATZ auf d.
24 III	-/-	+ -/+	+ -/-	OBJEKTTRÄGER geronnen

c) 1 Tr. h.L./RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
24 I	++/++	-/- ^(x)	+/+	
24 II	-/- ^(x)	-/- ^(x)	-/- ^(x)	(x) GELDROLLEN
24 III	-/- ^(x)	+/+	+/+	

d) 1 Tr. h.L.+5 Tr. AB-SERUM/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>	
24 I	++/++	-/-	+/+	
24 II	-/- ^(x)	-/- ^(x)	-/- ^(x)	(x) massive GELDROLLEN-
24 III	-/- ^(x)	+ -/+	+ -/+	BILDUNG

TABELLE 9

AUSWERTUNG DES BLINDVERSUCHES (28) NACH 22 h BEI -6°C

a) OHNE ZUSATZ

VERDÜNNUNG 1+2

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
	ma/mi	ma/mi	ma/mi
28 I	-/-	-/-	? /+-
28 II	-/-	-/-	+ -/+
28 III	-/+ -	-/+ -	+ /+

VERDÜNNUNG 1+1

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
28 I	+ -/?	+ -/?	-/-
28 II	-/-	-/-	+ /+
28 III	+ /+	-/-	+ /+

b) 1+2 VERDÜNNUNG, 10 Tr. AB-SERUM/RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
28 I	- /+-	+ -/+	-/-
28 II	- /+-	-/-	+ -/+
28 III	- /+-	-/-	- /+-

1+1 VERDÜNNUNG, 5 Tr. AB-SERUM/RÖHRCHEN

28 I	- /+-	- /+-	- /+-
28 II	-/-	-/-	+ -/-
28 III	- /+-	- /+-	- /+-

c) 1+2 VERDÜNNUNG, 2 Tr. h. L. /RÖHRCHEN

	<u>ANTI-A</u>	<u>ANTI-B</u>	<u>ANTI-AB</u>
28 I	- /+-	- /+-	- /+-
28 II	+ -/?	-/-	+ -/+
28 III	+ -/-	-/-	- /+-

1+1 VERDÜNNUNG, 1 Tr. h. L. /RÖHRCHEN

28 I	- /+-	- /+-	- /+-
28 II	- /+-	-/-	- /+-
28 III	? /+-	- /+-	- /+-

4. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, eine von BYRDY und ZABLOCKA beschriebene Technik zur Blutgruppenbestimmung im Schnee aufgefundenener Blutspuren zu reproduzieren oder auf andere Weise den Nachweis der Gruppensubstanzen zu führen. Als "künstlicher Schnee" diente Vereisungsgeschabsel aus dem Kühlschrank. Folgende Befunde wurden erhoben:

1) Die Blutgruppen A₁, B und O von aus Schnee isolierten Blutspuren lassen sich sicher nur bis zu Temperaturen von -4°C, bei einer Verdünnung bis zu 1+2 und bei einer Expositionszeit bis zu 4,5 Tagen nachweisen.

2) Im Temperaturbereich zwischen -5 und -7°C werden die Nachweisreaktionen unsicher. Es kann sowohl zu falschpositiven als auch zu falschnegativen Resultaten kommen. Makroskopisch sehen die Agglutinate auch nicht wie normale Agglutinate aus wie man sie von Frischblutproben kennt, sondern sie haben eine weißlich-fettig-schollige Beschaffenheit.

3) Ist die Expositionstemperatur tiefer als -7°C, so sind überhaupt keine Agglutinate mehr zu bekommen. Die Proben in den Röhrchen sind dann völlig hämolytisch.

4) Die Ergebnisse sind unabhängig von den von den polnischen Autorinnen empfohlenen Zusätzen (hypertonische NaCl- und CPD-Lösung). Auch ACD-Stabilisator, Formel B, oder AB-Serum hatten keinen Einfluß. Diese

Substanzen korrigieren weder eine falsche oder unsichere Agglutinationsreaktion, noch bewirken sie eine Regeneration der geschädigten Erythrozytenstruktur. Das war lediglich ausnahmsweise bei 2 von 84 Blutproben in 28 Versuchsserien der Fall, bei denen es sich offenbar um besonders resistente Erythrozyten handelte.

Insgesamt läßt sich damit sagen, daß die Methode vor dem Absorptionsverfahren zwar den Vorteil der Schnelligkeit besitzt, im Großen und Ganzen aber doch zu unsicher und anfällig ist, um routinemäßig Verwendung finden zu können. Lediglich bei genügend Spurenmaterial könnte man das Verfahren als Gegenkontrolle zum Absorptionsversuch hinzuziehen. Der einzige nicht störende Zusatz ist 3,8%iges Natriumcitrat, das bei den vorliegenden Versuchen bereits in den Proben enthalten war. Eine Aussage sollte nur dann gemacht werden, wenn makroskopisch ganz eindeutige Agglutinate festzustellen sind und auch die Serumgegenprobe mit dieser Aussage übereinstimmt.

Die Behauptung der polnischen Autorinnen, daß sich Erythrozyten aus hämolytischen Blutproben mit Hilfe von hypertonischer Lösung durch "Hämolyseversion" regenerieren lassen, kann auf Grund der vorliegenden Befunde nicht bestätigt werden.

5. LITERATUR

BYRDY, M. und I. ZABLOCKA: Über die Blutgruppenbestimmung im Schnee aufgefundenener Blutspuren.
Vortrag 3. Tagg. Ges Gerichtliche Medizin der
DDR, Berlin, 29.9.-1.10.71
persönliche Mitteilung

DAHR, P.: Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung. Stuttgart (Thieme) 1953

SCHLEYER, F. und I. OEPEN: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung.
²Lübeck (Schmidt-Römhild) 1977

SCHWARZACHER, W.: Blutspuren im Schnee.
Z. gerichtl. Med. 31, 231-222 (1939)

SPIELMANN, W. und S. SEIDL: Einführung in die Immunhämatologie und Transfusionskunde.
Weinheim/Bergstraße (Verlag Chemie) 1972

Frau Prof.Dr. Oepen danke ich für Thema, Arbeitsplatz und Anleitung bei den Versuchen sowie bei der Abfassung der Dissertation.

Bei Fräulein Mertens möchte ich mich für die freundlichen Hinweise bedanken.

LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am 15. Dezember 1951 in Peiskretscham/Gleiwitz (Oberschlesien).

Ich bin das einzige Kind meiner Eltern Georg Duda, von Beruf Kaufmann, nach dem Krieg jedoch im Bergbau tätig, und seiner Frau Hedwig, geb. Langer.

Nachdem wir im Sommer 1958 in die Bundesrepublik Deutschland übergesiedelt waren, wurde ich 1959 im Frühjahr in Dinslaken-Hiesfeld (NRW) eingeschult.

1963 wechselte ich auf das Neusprachliche Mädchengymnasium Dinslaken über, legte dort im Mai 1971 die Reifeprüfung ab und begann im Wintersemester desselben Jahres in Marburg/Lahn mein Medizinstudium.

Hier bestand ich nach dem Sommersemester 1972 das Vorphysikum, im Frühjahr 1974 die Ärztliche Vorprüfung, sowie im April 1975 Teil I des ärztlichen Staatsexamens nach der AO. Teil II der Prüfung legte ich im April 1977 ab, gefolgt vom dritten und letzten Abschnitt im Frühjahr 1978, nachdem ich im Lehrkrankenhaus Fulda das Praktische Jahr absolviert hatte.

Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Amon, Ax, Aziz, Baltzer, Barthelmai, Bode, Braasch,
Buchholz, Daume, Dennhardt, Dittrich, Dombrowski,
Doss, Egbring, Ehrhardt, Eißner, Eschenbach, Exner,
Friedrich, Fruhstorfer, Ganz, Gerdes, Geus, Golenhofen,
Graul, Grundner, Habermehl, Haberich, Hamelmann,
Hardewig, Havemann, Hensel, Hess, Hildebrandt,
Hilgermann, Hort, Huch, Ihm, Jacob, Joseph, Kaffarnik,
Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser, Knauff, Knoll,
Koransky, Kuni, Lange, Lauer, Lehmann, Linneweh, Lorenz,
Ludwig, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat,
Müller, Naber, Neurath, Niemeyer, Oepen, Petry, Pohlen,
Portig, Pots, Priebe, Riecken, Rodeck, Rohen, Rupec,
Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmid,
Schmitz-Moormann, Siegert, Siegrist, Slenczka,
Sodomann, Solcher, Straub, Struck, Sturm, Stutte,
Uhlarik, Welge-Lüssen, Wesemann, Willenbockel.

